

РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ИФА ТЕСТ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ЧУМЫ

Баймурзинов Б.Б.², Дерябин П.Н.², Пономарева Т.С.¹, Адамбеков Д.А.¹

¹ Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева,
г. Бишкек, Кыргызская Республика,

² Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций
им. М. Айкимбаева, г. Алматы, Республика Казахстан

Резюме. С использованием капсульного антигена *Y.pestis* и конъюгата на основе белка А стафилококков меченного пероксидазой хрена, разработана высокочувствительная и специфичная ИФА тест система для выявления антител к капсульному антигену *Y.pestis*. В отличие от ИФА тест системы с использованием конъюгата на основе антител против IgG человека, разработанная ИФА тест система универсальна и выявляет антитела не только у человека, но и у различных животных. Чувствительность данной ИФА тест системы выше, чем РПГА (реакция прямой гем-агглюцинации) той же специфичности. При исследовании иммунных сывороток против 5 других бактерий показана ее специфичность. Разработанная тест система была стабильной в течение 6 месяцев после изготовления (срок наблюдения) и может быть использована для оценки поствакцинального иммунитета у людей и верблюдов, иммунизированных против чумы, а также для оценки динамики антительного ответа в модельных опытах по иммунизации и заражению лабораторных животных и оценки серопозитивности зверьков при мониторинге природных очагов чумы.

Ключевые слова: чума, капсульный антиген F1, иммуноферментный анализ, конъюгат на основе белка, меченного пероксидазой хрена.

DEVELOPMENT OF A UNIVERSAL EIA TEST SYSTEM FOR THE DETECTION
OF ANTIBODIES TO THE CAUSATIVE AGENT OF THE PLAGUE

Baymurzinov B.B.², Deryabin P.N.², Ponomareva T.S.¹, Adambekov D.A.¹

¹ Kyrgyz State Medical Academy n.a. I.K. Akhunbaev,
Bishkek, the Kyrgyz Republic,

² Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Infections
n.a. M. Aikimbaev, Almaty, Republic of Kazakhstan

Resume. Using *Y.pestis* capsular antigen and conjugate based on protein A Staphylococcus, labeled with horseradish peroxidase highly sensitive and specific IEA test system for the detection of antibodies to capsular antigen is developed. In contrast to the EIA test system with use of a conjugate based on antibodies against human IgG EIA test there is developed universal system and it detects antibodies, not only in humans but also in different animals. The sensitivity of this EIA test system is higher than the specificity of the reaction of a straight line of gems agglutinations. In the study of immune sera against the 5 other bacteria there is shown its specificity. A test system was stable for 6 months after production (observation period) and can be used to assess the post-vaccination immunity in humans and camels immunized against plague, as well as to assess the dynamics of antibody response in model experiments on immunization and infection of laboratory animals and evaluation seropositive animals in the monitoring of natural foci of plague.

Keywords: plague, capsular antigen F1, enzyme immunoassay, protein-based conjugate labeled with horseradish peroxidase.

Введение. Природные очаги чумы занимают около 7% земной суши, в том числе около 40% территории Республики Казахстан [1]. Природные очаги чумы имеются также и на территории Кыргызской Республики. В комплекс мероприятий по контролю активности природных очагов чумы входят серологические исследования, т.е. оценка наличия и активности антител к возбудителю чумы у различных видов животных, обита-

ющих на территории природного очага. Эффективность этих исследований во многом определяется качеством и возможностями применяемых для выявления антител методов и иммунореагентов. Поэтому разработка новых реагентов и методов диагностики чумы для повышения эффективности иммунологических исследований чрезвычайно актуальна. При диагностике зоонозных инфекций имониторинге природных очагов необхо-

димы тест-системы, позволяющие выявлять антитела у людей и различных видов животных [2]. Поэтому для этой цели обычно используют реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА), позволяющую определять активность антител различной видовой принадлежности [3]. Однако чувствительность РПГА меньше, чем иммуноферментного анализа (ИФА), а также для РПГА отсутствует инструментальный учет и отсутствует возможность автоматизации всех этапов реакции. Но большинство ИФА тест систем готовят с использованием конъюгатов на основе антител против иммуноглобулинов. Такие конъюгаты являются видовыми и позволяют выявлять антитела только у одного вида животных или у человека. Поэтому при исследовании материала из природных очагов чумы, возникает необходимость в универсальных ИФА тест-системах, позволяющих исследовать на наличие и активность противочумных антител, образцы (сыворотки, смывы и т.д.) от различных видов животных и птиц. Такие тест-системы могут быть также использованы для изучения динамики антительного ответа у людей и верблюдов, иммунизированных против чумы, и в модельных опытах на лабораторных животных (кролики, морские свинки, белые мыши, крысы и т.д.).

Цель – получение и характеристика ИФА тест-системы с использованием конъюгата на основе белка А стафилококка и антигенов чумного микроба.

Материалы и методы

Работа была проведена на базе Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций имени М. Айкимбаева.

В работе использовали:

- капсульный антиген (F1) *Y.pestis*, полученный по методу E.E. Baker(1952 г.) [4];
- полистироловые планшеты фирмы Piovе (Италия);
- белок А, меченный пероксидазой хрена (производства компании Sigma-США) в качестве конъюгата;
- ТМБ раствор (раствор тетраметилбензидина) в качестве хромогенного субстрата;
- 0,1 М фосфатно-солевым буфером с твин-80;
- 2 М раствором серной кислоты в качестве стоп-реактанта;
- 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА);
- сыворотки крови людей, верблюдов, кроликов и морских свинок, иммунизированных живой чумной вакциной EV на 7, 14 и 21 день после вакцинации;

- сыворотки крови больших песчанок (2 мл), отловленных в Прибалхашском природном очаге чумы.

Забор крови у людей осуществляли при наличии добровольного информированного согласия. Забор крови у животных (за исключением верблюда) проводился под эфирным наркозом. Сыворотка верблюда, иммунизированного живой чумной вакциной, была любезно предоставлена специалистами ветеринарной службы (РГУ «Талдыкорганская противочумная станция»).

Для получения универсальных ИФА тест-систем для выявления антител к антигенам чумного микроба в лунки полистироловых планшет вносили по 100 мкл раствора антигена (F1) в рабочем разведении, планшеты инкубировали в течение 18 часов при температуре +4°C, свободные сайты на пластике блокировали 1% раствором БСА. Рабочее разведение антигенов определяли в предварительных опытах, используя для сенсibilизации плашек различные концентрации антигенов (от 200 до 25 мкг/мл), рабочим считали то разведение, при использовании которого выявлялся наибольший титр соответствующих антител. Для F1 рабочим разведением была концентрация 25 мкг/мл. Сенсibilизированные планшеты хранили при температуре +4°C до использования.

В работе также использовали антигенные эритроцитарные диагностикумы для выявления антител к капсульному антигену F1 *Y. Pestis* и экспериментальные серии ИФА тест-системы для выявления IgG антител к капсульному антигену F1 *Y. pestis*, полученные с использованием антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена.

ИФА ставили по стандартной методике: в лунки полистироловых планшет, сенсibilизированных антигенами чумного микроба вносили по 100 мкл исследуемой сыворотки соответствующих разведений, инкубировали в течение 18 часов при температуре +4°C, затем тщательно отмывали и вносили по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (белок А стафилококков, меченый пероксидазой хрена, или антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена), инкубировали при температуре (37±1)°C в течение 60 мин. Промывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером с твин-80 5 раз. После чего в планшеты вносили по 100 мкл хромогенной смеси. Через 20 мин (когда жидкость принимала синий цвет) останавливали реакцию внесением 50 мкл стоп-реактанта (2 М раствором серной кислоты). Рабо-

чье разведение конъюгата на основе белка А стафилококков, меченного пероксидазой, было определено в предварительных опытах и составило 1:5000 от исходного раствора. Конъюгат на основе антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена, в использованных наборах был в готовом (рабочем) разведении.

Результаты ИФА тест-системы учитывали спектрофотометрически на автоматическом микропланшетном ридере «Тесан» при длине волны 450 нм, принимая за положительный результат значение оптической плотности, не менее чем в 2 раза превышающее таковое в отрицательном контроле. Положительным контролем служила сыворотка человека, иммунизированного живой

чумной вакциной, взятая на 21 день после вакцинации. Отрицательным контролем служила сыворотка человека, не имеющая антител к антигенам чумного микроба по результатам исследования в РПГА.

РПГА ставили микрометодом по обычной методике. Учет результатов проводили визуально.

В работе применяли статистические методы частных сравнений серий. Результат считали значимым при $P \leq 0,05$.

Результаты

Результаты параллельного исследования сывороток человека, верблюда, кролика и морской свинки, иммунизированных живой чумной вакциной, и большой песчанки (серопозитивной) приведены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнение эффективности использованных методов выявления антител к капсульному антигену F1 *Y. pestis*

№ пп	Исследуемая сыворотка от	Титр сыворотки при использовании*		
		РПГА	ИФА с конъюгатом на основе анти-IgG человека	ИФА с конъюгатом на основе белка А стафилококка
1	Вакцинированный человек	1:80	1:640	1:640, 1:1280
2	Вакцинированный кролик	1:640, 1:1280	Отр.	1:5120
3	Вакцинированный верблюд	1:320, 1:640	Отр.	1:2560, 1:5120
4	Вакцинированная морская свинка	1:320	Отр.	1280
5	Серопозитивная большая песчанка	1:160, 1:320	Отр.	1:2560, 1:5120

Примечание (здесь и далее в таблицах). * - каждая сыворотка исследовалась дважды

Как видно из приведенных данных, при использовании ИФА с конъюгатом на основе анти-IgG человека, антитела в капсульному антигену возбудителя чумы обнаружены только в сыворотке человека, иммунизированного живой чумной вакциной, в сыворотках животных при помощи этой ИФА тест-системы антитела к капсульному антигену возбудителя чумы не обнаружены. При использовании РПГА и ИФА с использованием конъюгата на основе белка А стафилококка антитела к капсульному антигену были выявлены во

всех исследуемых сыворотках. Следует, однако, отметить что титр антител в ИФА был в 4-16 раз больше, чем в РПГА, что свидетельствует о более высокой чувствительности ИФА по сравнению с РПГА.

Как видно из таблицы 2, ИФА тест-систему с конъюгатом на основе белка А можно использовать для оценки динамики антител продукции при вакцинации людей и животных: с 7 по 21 день после иммунизации титр антител к капсульному антигену вырос в 8-32 раза.

Таблица 2

Данные изучения динамики активности (титра) антител при вакцинации

№ пп	Исследуемая сыворотка от	Титр антител* после иммунизации живой чумной вакциной на		
		7-ой день	14-ый день	21-ый день
1	Вакцинированный человек	1:160	1:320	1:1280
2	Вакцинированный кролик	1:160	1:1280	1:5120
3	Вакцинированная морская свинка	1:160	1:320	1:2560

Для оценки специфичности ИФА тест-системы с конъюгатом на основе белка А стафилококков

были исследованы иммунные сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных антигенами других бактерий. Результаты приведены в

таблице 3. Все сыворотки были параллельно исследованы в РПГА.

Таблица 3

Оценка специфичности ИФА тест-системы с конъюгатом на основе белка А

№ пп	Специфичность исследуемой сыворотки	Титр антител к капсульному антигену* в	
		РПГА	ИФА
1	Туляремийная	Отр.**	Отр.
2	Бруцеллезная	Отр.	Отр.
3	Сибиреязвенная	Отр.	Отр.
4	Шигеллезная	Отр.	Отр.
5	Сальмонеллезная	Отр.	Отр.

Примечание: ** - меньше 1:20

Как видно, результаты исследования сывороток другой специфичности были отрицательными, что свидетельствует о специфичности разработанной ИФА тест системы на основе капсульного антигена *Y. pestis* и конъюгата на основе белка А стафилококков, меченого пероксидазой хрена.

Для оценки стабильности разработанной тест-системы, набор, содержащий сенсibilизированные капсульным антигеном планшеты, конъюгат и другие компоненты, необходимые для постановки ИФА, были заложены на хранение при

температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$. В качестве референс- сыворотки использовали сыворотку кролика, иммунизированного живой чумной вакциной, взятую на 21 день после иммунизации. Сыворотка была разлита по ампулам и лиофильно высушена. Стабильность ИФА тест-системы оценивали: в день ее получения, через 1, 2 недели, 1, 3 и 6 месяцев после изготовления. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4

Оценка стабильности ИФА тест системы

Титр антител* при хранении в течение						
0	1 неделя	2 недели	3 недель	1 месяца	3 месяцев	6 месяцев
1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:5120	1:2560
1:2560	1:2560	1:1280	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
1:1280	1:2560	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	1:2560
1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:2560	1:1280	1:1280

* - каждое исследование повторяли 4 раза

Предварительные данные, полученные на одной серии препарата в течение 6 месяцев наблюдения показывают, что разработанная ИФА тест система стабильна в течение изученного срока хранения. Но эти исследования продолжаются.

Возможность использования разработанной ИФА тест системы для выявления антител к кап-

сульному антигену *Y. pestis* для выявления серопозитивных носителей в природных очагах чумы была продемонстрирована при исследовании 8 сывороток крови больших песчанок, отловленных в Прибалхашском природном очаге чумы (таблица 5).

Таблица 5

Выявление антител к капсульному антигену в сыворотке крови больших песчанок

№ сыворотки	Титр антител к капсульному антигену в	
	РПГА	ИФА
1	1:100	1:640
2	Отр	Отр
3	1:100	1:640
4	1:200	1280
5	Отр	Отр
6	Отр	Отр
7	Отр	Отр
8	Отр	Отр

В 3-х из 8 исследованных сывороток при помощи РПГА и ИФА обнаружены антитела к капсульному антигену *Y. pestis*, но титр антител в ИФА был в 6,4 раза больше, чем в РПГА, что еще раз подтверждает более высокую чувствительность ИФА.

Обсуждение

ИФА становится наиболее часто применяемым методом иммунодиагностики инфекционных заболеваний. Этому способствуют его высокая чувствительность, специфичность, возможность инструментального учета и автоматизации всего процесса выполнения анализа. Для диагностики зоонозных инфекций большой интерес представляют тест-системы, позволяющие выявлять антитела у различных видов животных и человека [2,3]. Это позволяет получить лабораторные данные для оценки, как эпидемиологической ситуации, так и активности эпизоотического процесса, что важно при мониторинге природных очагов инфекционных заболеваний, особенно относящихся к группе особо опасных инфекций. Это касается и мониторинга природных очагов чумы, включая мониторинг эффективности иммунопрофилактики. Разработанная ИФА тест-система с использованием капсульного антигена *Y. pestis* и конъюгата на основе белка А стафилококков, меченного пероксидазой хрена, обладает универсальностью и позволяет выявлять соответствующие антитела не только у людей, но и у различных видов животных. По чувствительности она превосходит используемые в настоящее время эритроцитарные диагностикумы, а по специфичности не уступает им. Предварительные результаты показали, что эта тест система стабильна по крайней мере в течение 6 месяцев хранения и может быть использована для оценки динамики антительного ответа у людей и животных, иммунизированных живой чумной вакциной, а также для обнаружения серопозитивных зверьков в природных очагах чумы. Но исследования по оценке

стабильности этой системы и возможности ее использования при мониторинге природных очагов чумы необходимо продолжать.

Выводы:

1. Испытания в модельных экспериментах разработанной «универсальной ИФА тест-системы для выявления антител к антигенам возбудителя чумы» свидетельствуют о перспективности ее использования для получения информации о специфическом антительном ответе грызунов на контакт с чумным микробом.

2. Разработанная тест-система может быть использована для оценки поствакцинального иммунитета у людей и верблюдов, иммунизированных против чумы, а также для оценки динамики антительного ответа в модельных опытах по иммунизации и заражению лабораторных животных.

3. Внедрение тест-системы в практику отечественного здравоохранения будет способствовать эффективному эпизоотологическому мониторингу за природными очагами чумы.

Литература.

1. *Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан /под ред. Л.А. Бурделова.- Алматы, 2012. -232 с.*
2. Колясников О.В., Григоренко В.Г., Егоров А.М., Lange S., Schmid R.D. Получение рекомбинатного конъюгата пероксидазы хрена С FАВ-фрагментом антител с использованием экспрессионной системы *Pichiapastoris*//*Acta Naturae-2011-Vol.3, № 3 (10).*-P.88-95.
3. Tugambayev T.I., Atshabar B. *Diagnostic immunoreagents for inspection of the natural foci of especially dangerous and quarantine infections. Materials of International Sci. Conference –Actual Problems of Allergology and Immunology.- Astana, 2005. – P.104-106.*
4. Baker, E.E. *Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the soluble antigen of Pasteurella pestis / [E.E. Baker et al.]// J. Immunol. -1952. -Vol. 68, № 2. - P. 131-145.*